

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Matej Kurilj, apsolvent

Diplomski studij: Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

VARIJABILNOST PŠENIČNE TRAVE (*Triticum*) S OBZIROM NA  
BIORASPOLOŽIVOST CINKA – USPOREDBA *IN VITRO* METODA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Matej Kurilj, apsolvent

Diplomski studij: Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

VARIJABILNOST PŠENIČNE TRAVE (*Triticum*) S OBZIROM NA  
BIORASPOLOŽIVOST CINKA – USPOREDBA *IN VITRO* METODA

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskoga rada:

1. izv.prof.dr.sc. Sonja Petrović, predsjednik
2. izv.prof.dr.sc. Andrijana Rebekić, mentor
3. izv.prof.dr.sc. Miroslav Lisjak, član

Osijek, 2019.

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature .....	3
2.1. Biodostupnost i bioraspoloživost .....	3
2.2. Metode za ispitivanje <i>in vitro</i> bioraspoloživosti .....	4
2.3. Ljekovita svojstva soka pšenične trave .....	5
2.4. Cink .....	7
3. Materijali i metode .....	8
3.1. Biljni materijal.....	8
3.2. Uzgoj pšenične trave .....	8
3.3. Priprema soka od pšenične trave .....	9
3.4. Simulacija probave <i>in vitro</i> .....	10
3.4.1. Metoda za simulacije probave po Kiersu .....	11
3.4.2. Metoda simulacije probave po Minekusu.....	13
3.5. Tehnika mjerenja na ICP-OES-u.....	15
3.6. Statistička obrada podataka .....	16
4. Rezultati .....	17
4.1. Koncentracija cinka u soku od pšenične trave nakon provedene simulacije probave <i>in vitro</i> .. .....	17
4.2. Razlike između sorata pšenice u koncentraciji cinka nakon provedene simulacije probave <i>in vitro</i> .....	17
4.3. Razlike između primijenjenih metoda za simulaciju probave <i>in vitro</i> .....	19
5. Rasprava.....	21
6. Zaključak.....	25
7. Popis literature .....	26
8. Sažetak .....	29
9. Summary .....	30
10. Popis tablica .....	31
11. Popis slika .....	32

12. Popis grafikona .....	33
Temeljna dokumentacijska kartica .....	34
Basic documentation card .....	35

## 1. Uvod

Pšenica (rod *Triticum*) je jedna od glavnih kultura koja se koriste za ljudsku i stočnu hranu, a pripada „velikoj trojci“ žitarica uz ječam i rižu. Ova žitarica se uzgaja diljem svijeta od 67° S u Skandinaviji i Rusiji do 45° J u Argentini, uključujući povišene regije u tropima i subtropima (Feldman i sur., 1995.). Velika zastupljenost pšenice u proizvodnji diljem svijeta rezultat je njene velike prilagodljivosti različitim klimatskim prilikama. Uz to pšenica ima visok prinos, a zрно se koristit u prehrambenoj industriji te za ishranu domaćih životinja. Pšenica obiluje esencijalnim aminokiselinama, mineralima i vitaminima, fitonutrijentima i prehrambenim vlaknima korisnim u ljudskoj prehrani (Shewry, 2009.). Gotovo polovica kalorija koje se svakodnevno koriste u ljudskoj prehrani potječe izravno iz zrna žitarica, od čega čak četvrtina dolazi iz pšenice (González-Esteban, 2017.).

Osim kao osnovna krušarica, pšenica se može koristiti i kao dodatak prehrani u obliku svježeg soka, praha ili tableta napravljenih od pšenične trave. Pšenična trava predstavlja mlade izdanke pšenice, koji se pred kraj busanja beru i koriste za pripremu svježeg soka, praha ili tableta. Najučestaliji način upotrebe pšenične trave je u obliku soka koji se dobije cijedenjem svježih listova. Sok pšenične trave je poznat pod nazivom "zelena krv" zahvaljujući visokom sadržaju klorofila, koji ima kemijsku strukturu sličnu strukturi hemoglobina. Klorofil, koji čini do 70% spojeva soka od pšenične trave, ublažava infekcije, liječi rane, sprječava upale i pomaže u oslobađanju od parazitskih infekcija, a tri najvažnija učinka pšenične trave na ljudsko tijelo su: pročišćavanje krvi, detoksikacija jetre i čišćenje debelog crijeva (Mujoriya i Bodla, 2011.). Uz to, pšenična trava sadrži mnoštvo vitamina (A, C, E i B kompleks), minerala, aminokiselina i enzima. Razni enzimi odgovorni za farmakološka djelovanja pšenične trave su proteaza, amilaza, lipaza, citokrom-oksidaza, trans-hidrogenaza i superoksid-dismutaza. Pšenična trava sadrži i mnoštvo minerala poput kalcija, fosfora, magnezija, natrija, kalija, cinka, bora, mangana, molibdena, željeza i cinka (Padalia i sur., 2010.). Osim toga, važan razlog uporabe soka od pšenične trave u medicinske svrhe je njegovo antioksidativno djelovanje, koje je rezultat visokog sadržaja bioflavonoida, poput apigenina, kvercetina i luteolina. Drugi prisutni spojevi koji čine ovu travu terapijski učinkovitom su indolni spojevi, kolin i amigdalin (Padalia i sur., 2010.). Zbog svog kemijskog sastava, sok pšenične trave može pomoći u podizanju razine hemoglobina, albumina i proteina (Dey i sur., 2006.).

Pšenična trava je bogata raznim hranjivim tvarima, od ukupne količine određenog nutrijenta, samo će dio biti iskoristiv u organizmu. Količina nutrijenata koja je potencijalno dostupna za obavljanje fiziološke funkcije u organizmu, predstavlja njegovu bioraspoloživost. Bioraspoloživost se u laboratorijskim uvjetima ispituje simulacijom probave *in vitro*. Zbog jednostavnosti i relativno niske cijene koštanja, najčešće se provode statičke metode simulacije probave. S obzirom da nema standardizirane metode za simulaciju probave, vrlo je teško usporediti rezultate do sada objavljenih istraživanja bioraspoloživosti.

Cilj ovog rada je ispitati varijabilnost sorata pšenice (*Triticum aestivum* L.) s obzirom na bioraspoloživost cinka iz svježe iscijeđenog soka pšenične trave. Uz to, u radu će se usporediti dvije metode za simulaciju probave *in vitro* (Kiers, 2001. i Minekus i sur. 2014.).

## 2. Pregled literature

### 2.1. Biodostupnost i bioraspoloživost

„*In vivo*“ bioraspoloživost je izuzetno teško odrediti (zbog nemogućnosti pristupa organima u kojima su se apsorbirali spojevi), a kako bi se što preciznije odredile točne vrijednosti koncentracija apsorbiranih i iskorištenih spojeva u tijelu koriste se pojmovi apsolutna i relativna bioraspoloživost (Holst i Williamson, 2008.). Apsolutna bioraspoloživost predstavlja točnu koncentraciju spoja koja ulazi u metabolizam, izračunana kao područje ispod krivulje nakon oralne konzumacije, uspoređena s područjem ispod krivulje nakon intravenozne primjene. Relativna bioraspoloživost, u prehrani, koristi se za uspoređivanje bioraspoloživosti spoja iz jednog izvora u usporedbi s drugim. Međutim, bioraspoloživost ima različita značenja ovisno o područjima ispitivanja na koja se odnosi. Na primjer, s farmakološkog stajališta, bioraspoloživost je brzina i stupanj u kojem se molekula apsorbira i postaje dostupna na mjestu djelovanja lijeka. S druge strane, bioraspoloživost s prehrane točke gledišta predstavlja skupinu hranjivih tvari koje su pohranjene ili dostupne za fiziološke funkcije, pa je prema tome bioraspoloživost skup hranjivih sastojaka ili bioaktivnih spojeva koji se u konačnici koriste u organizmu.

Pojam bioraspoloživosti (engl. bioavailability) koristi se da bi se odredila koncentracija nekog elementa ili spoja koja je apsorbirana, raspoređena u tkivo, metabolizirana i na kraju izlučena (Holst i Williamson, 2008.). Bioraspoloživost je povezana s koncentracijom određenog spoja ili njegovog metabolita koji se apsorbira i postaje aktivan. Za razliku od bioraspoloživosti, biodostupnost (engl. bioaccessibility) predstavlja količinu nekog spoja koja se tijekom procesa probave otpušta u organizam i postaje raspoloživa za apsorpciju. *In vitro* biodostupnost se procjenjuje statičkim metodama za simulaciju probave. Takve metode se najčešće sastoje od tri faze, koje uključuju simulaciju probave u ustima, simulaciju prave u želucu i simulaciju probe u tankim crijevima (Etcheverry i sur., 2012.). Koncentracija elementa ili spoja koji se oslobodi i postane dostupna za apsorpciju predstavlja biodostupnost tog elementa ili spoja. Da bi se utvrdila *in vitro* bioraspoloživost nekog elementa ili spoja, potrebno je utvrditi koliki dio ili postotak od biodostupne koncentracije, može biti apsorbiran u organizmu. Statičke *in vitro* metode za utvrđivanje bioraspoloživosti, osim simulacije probave u ustima, želucu i tankim crijevima, uključuju i Caco-2 stanični model. Stanice Caco-2 predstavljaju stanice adenokarcinoma debelog crijeva, a koriste se za simulaciju stanične stijenke crijeva i

omogućavaju utvrđivanje bioraspoloživosti. Element ili spoj koje se apsorbira u stanice Caco-2, vrlo vjerojatno bi se apsorbirao i u stanice crijeva u organizmu.

Mnogi faktori utječu na bioraspoloživost spoja, a mogu se podijeliti na egzogene i endogene. Scholz i Williamson (2007.) u egzogene čimbenike ubrajaju razinu složenosti matriksa hrane, kemijski oblik spoja te strukturu i količinu spoja. S druge strane, endogeni faktori predstavljaju vrijeme pražnjenja metabolizma i transporta u crijevima, vezanje proteina u krvi i tkivima.

## **2.2. Metode za ispitivanje *in vitro* bioraspoloživosti**

Metode za ispitivanje bioraspoloživosti mogu se podijeliti na *in vivo* i *in vitro* metode. *In vivo* metode predstavljaju metode kojima se učinci ispitivanja promatraju na ljudima, životinjama i biljkama. One su skuplje i etički upitne u odnosu na *in vitro* metode. Prednost *in vitro* metoda je ta što se istraživanje može provesti na velikom broju uzoraka, brže su u odnosu na *in vivo* metode, potrebno je manje početnog materijala i znatno manji prostor, odnosno brže su, jednostavnije i jeftinije, nego metode za utvrđivanje bioraspoloživosti *in vivo*. *In vitro* metode za ispitivanje bioraspoloživosti mogu se podijeliti na statičke i dinamičke. Statičke *in vitro* metode, predstavljaju simulacije fizioloških uvjeta koje uključuju dvije ili tri faze probave (oralnu, želučanu i crijevnju). Prilikom statičkih metoda simulacije probave uvjeti (koncentracija enzima, soli) ostaju isti tijekom pojedine faze simulacije probave. Dinamičke metode ne uključuju jedinstvenu koncentraciju enzima, otopina soli i drugih sastojaka, već se njihova koncentracija mijenja, ovisno o potrebama, tijekom faza simulacije probave.

Metodama za simulaciju probave *in vitro*, pokušavaju se oponašati fiziološki *in vivo* uvjeti tijekom probave, uzimajući u obzir prisustvo probavnih enzima, njihove koncentracije, pH vrijednosti u pojedinoj fazi probave, trajanje probave u pojedinom dijelu probavnog trakta te koncentracije soli u puferima.

Rodriguez i sur. (1999.) su ispitivali bioraspoloživost arsena u onečišćenim tlima. *In vitro* metoda provedena je u dvije faze koje su uključivale simulaciju probave u želudcu i crijevima. Simulacija probave provedena je u vodenoj kupelji pri tjelesnoj temperaturi



(37°C), a anaerobno stanje održavano je stalnim raspršivanjem argona kroz otopinu. pH se tijekom cijelog postupka pratio i povećavao ili smanjivao po potrebi.

Kiers i sur. (2001.) razvili su metodu za simulaciju probave *in vitro* koja omogućuje razlikovanje i utvrđivanje različitih razina probavljivosti (razgradljivost, topljivost i probavljivost). Metoda za simulaciju probave *in vitro* po Kiersu i sur. (2001.) uključuje sve tri faze probave.

Za razliku od Kiersa i sur. (2001.), Etcehverry i sur. (2012.) koriste metodu za simulaciju probave *in vitro* u kojoj je izostavljena faza simulacije probave u ustima te uključuje samo simulaciju probave u želucu i tankim crijevima. Za simulaciju probave u želudcu, u uzorak se dodaje pepsin prije nego što se pH spusti na 2 (kod odraslih osoba) ili na 4 (kod djece). Prije početka simulacije probave u crijevima pH se podiže na 5,5 - 6 i dodaje se pankreatin (koji se sastoji od koktela pankreatičnih enzima kao što je pankreatičnih amilaza, lipaza, ribonukleaza i proteaze kao što je tripsin) i želučane soli.

Minekus i sur. (2014.) tvrde da metode za ispitivanje *in vitro* bioraspoloživosti su brže i jeftinije u odnosu na *in vivo* metode, manje su radno intenzivne i nemaju etičkih ograničenja. Navedena svojstva omogućuju veliki broj uzoraka koji se mogu istovremeno proučavati u razne svrhe. Minekus i sur. (2014.) su proučavali statičku metodu za simulaciju probave *in vitro* koja je primjenjiva za sve vrste hrane. Njihova preporuka je da se za hranu u tekućem obliku simulacija probave provodi kroz glavne faze probave (želučana i crijevna faza), dok se za hranu u krutom obliku uz dvije navedene faze provodi i simulacije probave u ustima.

### **2.3. Ljekovita svojstva soka pšenične trave**

Kada se govori o ljekovitim svojstvima soka pšenične trave biljke *Triticum aestivum*, može se reći da ona ima širok raspon zdravstvenih prednosti zbog kojih je sve više ljudi koristi. Može se konzumirati u obliku svježeg ili smrznutog soka, tableta ili praha. Iako mutno zelena boja soka nije baš primamljiva, a i okusom nije slična napitcima koji se konzumiraju na dnevnoj bazi, sok pšenične trave može pomoći u otklanjanju i/ili ublažavanju zdravstvenih poteškoća.

Ann Wigmore (1985.) u svojoj knjizi o piše kako sok pšenične trave proširuje krvne žile i omogućuje lakši protok krvi, odnosno poboljšava cirkulaciju. Samim time, proširenost krvnih

žila omogućuje bolju prehranu stanicama i uklanjanje štetnih tvari iz istih. Budući da je pšenična trava bogat izvor kalcija, njezin sok sadrži količinu kalcija poput mlijeka.

Best i Ridout (1993.) su u svojoj studiji ispitivali učinak kolina na jetru. Eksperimentalne životinje bile su podvrgnute dijeti bogatoj kolesterolom. Sok pšenične trave sadrži kolin, koji sprječava taloženje masti u jetri.

Marwaha i sur. (2004.) su proveli kliničko ispitivanje pacijenata koji boluju od talasemije. Pacijenti su na dnevnoj bazi konzumirali sok pšenične trave, a istraživanjem je utvrđeno da je: kod 50% pacijenata smanjenja potreba za transfuzijom do 25%, srednji vremenski interval između transfuzija porastao je za 29,5% dok razina hemoglobina nije bila snižena smanjenjem volumena transfuzije. Uz to pacijenti su obavijestili liječnike o povećanom apetitu i smanjenjem bolova u mišićima.

Hvatum i sur. (2006.) utvrdili su da sok pšenične trave (90 – 120 ml) može poslužiti kao klistir prilikom oboljenja debelog crijeva, kroničnog zatvora ili krvarenja.

Wheat i Currie (2008.) tvrde kako sok pšenične trave predstavlja potpuni izvor proteina koji imaju različite funkcije u tijelu. Taj sok je brz i siguran način za detoksikaciju organizma. Visoke razine enzima i aminokiselina služe kao prirodno sredstvo za čišćenje koje utječe na detoksikaciju jetre, uklanja teške metale iz krvotoka i usporava proces starenja stanica. Osim toga, isti autori tvrde da antioksidativno djelovanje soka pšenične trave sprječava oksidacijsko oštećenje deoksiribonukleinske kiseline (DNA), peroksidaciju lipida, učinke na transformaciju i diferencijaciju stanica, zatim da inhibira proliferaciju stanica i ekspresiju onkogenih gena (gena koji uzrokuju rak).

Handzel i sur. (2008.) proučavali su utjecaj soka pšenične trave i tjelovježbe (trčanja) na ljudski organizam. Kod ispitanika koji su konzumirali sok pšenične trave prije vježbanja ( $\approx$  60 ml) zasićenost kisikom prilikom vježbanja bila je u prosjeku 0,31% viša nego kod skupine ispitanika koji nisu konzumirali sok. S druge strane, tijekom oporavka, koji je trajao 8 minuta, zasićenost kisikom kod osoba koje su konzumirale sok pšenične trave bila je 0,26% veća u odnosu na osobe koje nisu konzumirale isti. Znanstvenici su došli do zaključka da postoji mehanizam u tijelu koji povećava razinu kisika u krvi prilikom konzumacije soka pšenične trave.

Sok pšenične trave pomaže u izgradnji crvenih krvnih stanica i potiče rast zdravog tkiva. Pšenična trava bi se trebala konzumirati sat vremena prije obroka tako da omogući organizmu da ju u potpunosti metabolizira. Također, kada se pije sok preporučeno je konzumirati najmanje 1 L vode kako bi se maksimalno iskoristila njegova ljekovita svojstva (Rana i sur., 2011.).

Prema podacima Chauhana (2014.) sok pšenične trave pomaže pri poboljšanju sna, povećanju snage, reguliranju krvnog tlaka i šećera, gubitku tjelesne mase, poboljšava mentalnu funkciju, ali i funkciju pluća, srca i reproduktivnih organa. Ima ulogu liječenja / sprječavanja artritisa, grčenja mišića, talasemije, hemolitičke anemije, raka, astme, alergija, crijevnih bolesti i koristit se prilikom detoksikacije. Pomoću njega može se održavati zdravlje kože, zubi, očiju, mišića i zglobova, ali i smanjiti umor. Sok pšenične trave može poslužiti za ispiranje usta prilikom upala grla, a isto tako sprječava zubobolju.

## **2.4. Cink**

Cink je teški metal ( $\rho = 7,133 \text{ g cm}^{-3}$ ) kojega biljke usvajaju kao kation  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $[\text{Zn}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ ,  $\text{Zn}(\text{OH})^+$  i Zn kelete (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Spada u skupinu mikroelemenata i sastavni je dio mnogih enzima (karboanhidraza, dehidrogenaza, alkohol-dehidrogenaza, superoksid dismutaza i drugi). Sudjeluje u biosintezi DNA i RNA, sintezi proteina i auksina, stabilizaciji membrana. Njegova prisutnost u biljkama povećava otpornost prema bolestima, suši i niskim temperaturama. S druge strane, kada govorimo o ljudima, nedostatak cinka pogađa epidermalni, gastrointestinalni, živčani, imunološki, skeletni i reproduktivni sustav. Također tijekom razdoblja rasta, manjak cinka može dovesti do poremećaja u razvoju. Najčešći simptomni nedostatka cinka su: gubitak apetita, kose i tjelesne težine, dijareja, sporo zacjeljivanje rana, smanjen osjećaj mirisa i okusa. Unos cinka u tijelo može se povećati konzumiranjem crvenog mesa, školjki, graha, leća, oraha i jaja.

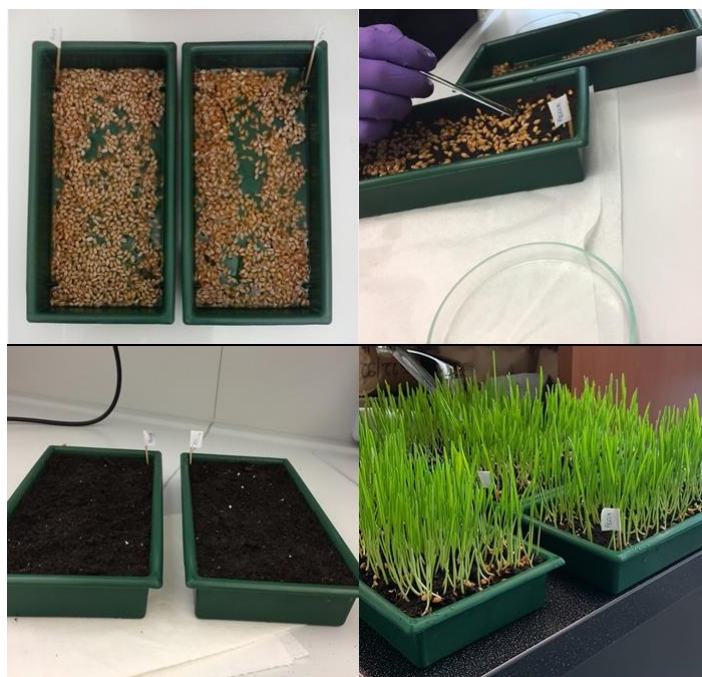
### **3. Materijali i metode**

#### **3.1. Biljni materijal**

Ovo istraživanje provedeno je na šest sorata pšenice (*Triticum aestivum*, L.), od kojih su četiri sorte hrvatskog (Pipi, Divana, Katarina, Felix), a dvije austrijskog (Sw Maxi i Eurofit) porijekla. Zrno pšenice korišteno u pokusu uzeto je iz gen kolekcije Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, a dobiveno je iz projekta HRZZ „Stvaranje pšenice za budućnost – potraga za novim genima iz postojećih izvora“. Sorte pšenice koje su uključene u ovo istraživanje izabrane su na temelju rezultata o koncentracijama Zn u zrnu i listu zastavičaru u punoj zriobi, dobivenih iz prethodno provedenih istraživanja. Za istraživanje su izabrane sorte koje se razlikuju u koncentracijama Zn u zrnu (24,6 - 37,2 mg kg<sup>-1</sup>) i listu zastavičaru (4,46 – 18,68 mg kg<sup>-1</sup>).

#### **3.2. Uzgoj pšenične trave**

Zrno izabranih sorata pšenice isprano je u deioniziranoj vodi te stavljeno na naklijavanje. Nakon 48 sati, naklijana zrna su posijana u plitice koju su sadržavale Brill Bio organski supstrat za presadnice. Zrno je raspoređeno i prekriveno tankim slojem supstrata. Posijana pšenica postavljena je na stolove u Laboratoriju za sjemenarstvo pri sobnoj temperaturi i prirodnoj svjetlosti. Uzgoj je trajao 12 dana, tijekom kojih je pšenica zalijevana običnom vodom (Slika 1).



Slika 1. Naklijavanje, sjetva i rast pšenične trave (Foto original: Matej Kurilj)

### 3.3. Priprema soka od pšenične trave

Dvanaesti dan nakon sjetve, škarama su odrezani svi listovi s mladih biljaka (Slika 2) na visini od 2 do 3 cm iznad površine supstrata. Listovi su zatim izvagani, kako bi se utvrdila ukupna masa listova (g). Za pravljenje soka od pšenične trave korišten je ručni sokovnik za pšeničnu travu (Wheatgrass BL-30).



Slika 2: Priprema svježeg soka od pšenične trave i priprema uzoraka za simulaciju probave *in vitro* (izvor: <http://161.53.194.251/~wheat4grass/gallery/> )

### 3.4. Simulacija probave *in vitro*

U provedenom istraživanju za simulaciju probave *in vitro* korištene su metode po Kiersu (Kiers i sur., 2001.) i po Minekusu (Minekus i sur., 2014.). Navedene metode vrlo su slične po kemijskom sastavu korištenih pufera, korištenim enzimima i njihovim koncentracijama. Najveća razlika među metodama je u tome što se u po metodi prema Minekusu, za uzorke tekuće hrane (u ovom slučaju je to sok pšenične trave) ne provodi dio u kojemu se simulira probava u ustima.

### 3.4.1. Metoda za simulacije probave po Kiersu

Prilikom simulacije probave *in vitro* prema metodi po Kiersu (Kiers i sur., 2001.), uzorak prolazi tri faze probave, koje uključuju simulaciju probave u ustima, simulaciju probave u želucu te simulaciju probave u crijevima. Optimalne koncentracije soli u puferima i koncentracije enzima u otopinama za simulaciju probave prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Kemikalije potrebne za metodu po Kiersu i sur. (2001.)

Usta (g L <sup>-1</sup> )		Želudac (g L <sup>-1</sup> )		Crijeva (g L <sup>-1</sup> )	
$\alpha$ amilaza	12500 <sup>1</sup>	lipaza	0,1	pankreatin	20
NaCl	1,5	pepsin	0,125	žuč	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5	NaCl	3,1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,68
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5	KCl	1,1	NaHPO <sub>4</sub>	0,3
		Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,6	NaHCO <sub>3</sub>	0,84
		CaCl <sub>2</sub>	0,11		

<sup>1</sup> aktivnih jedinica po litri

Otopine za simulaciju probave u ustima, želucu i crijevima pripremljene su unaprijed i spremljene su u hladnjak. Automatskom pipetom uzeto je 5 ml svježe iscijeđenog soka pšenične trave i prebačeno u Falcon epruvete volumena 50 ml. Uzorci su prelivevi sa 20 ml destilirane vode te ostavljeni na sobnoj temperaturi 30 minuta. Potom je u svaki uzorak dodano 2 ml otopine usta (zagrijane na 37 °C) u koju je netom prije dodana  $\alpha$ -amilaza (Sigma Aldrich A0521). Uzorci prelivevi otopinom koja simulira slinu, inkubirani su 30 minuta na 37 °C, pri brzini treskanja od 190 u vodenoj kupelji GFL 1092 (Slika 3).



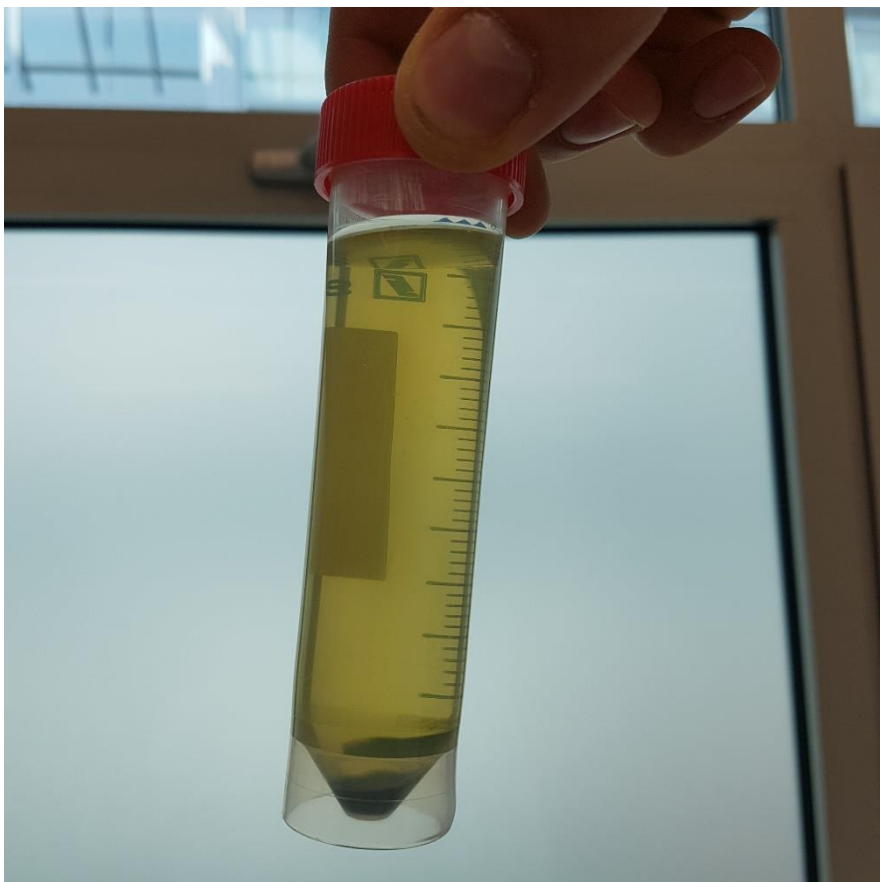
Slika 3. Vodena kupelj s treskalicom ( izvor: <http://161.53.194.251/~wheat4grass/gallery/> )

Nakon pola sata, uzorci su izvađeni iz vodene kupelji te je izmjerena pH vrijednost uzoraka. pH vrijednost u uzorcima soka od pšenične trave nakon simulacije probave u ustima kretala se u rasponu od 5,81 do 6,57, te je za spuštanje pH vrijednosti uzoraka dodavano između 75 i 85  $\mu\text{L}$  5M HCl-a. U svim uzorcima je pH vrijednost spuštena na  $3,0 \pm 0,25$ . Nakon toga u uzorke je dodana je otopina želudca (8 ml/uzorku) te su uzorci stavljeni na inkubaciju u trajanju od 60 minuta u vodenu kupelj pri brzini treskanja 190 i temperaturi  $37^\circ\text{C}$ .

Nakon druge inkubacije, ponovno je izmjerena pH vrijednost uzoraka. Očitane pH vrijednosti uzoraka kretale su se između 3,18 - 4,83, te je pH vrijednost uzorka pomoću 1 M  $\text{NaHCO}_3$  podignuta na  $6 \pm 0,25$ . Nakon toga u uzorke je dodana otopina crijeva (10 ml/uzorku). Uzorci su inkubirani 30 minuta pri brzini treskanja od 190 i temperaturi od  $37^\circ\text{C}$ .

Po završetku inkubacije, uzorci su izvađeni te stavljeni u led na 5 minuta, a potom na centrifugiranje na 15 minuta pri  $4^\circ\text{C}$  i 4000 rpm. Nakon centrifugiranja došlo je do odvajanja tekuće i krute faze uzorka (Slika 4).





Slika 4. Tekuća i kruta faza uzorka ( Foto original: Matej Kurilj)

U epruvete volumena 15 ml prelivena je tekuća faza uzoraka koji su pohranjeni su na  $-80^{\circ}\text{C}$  u ultra hladni zamrzivač.

#### **3.4.2. Metoda simulacije probave po Minekusu**

Prilikom simulacije probave metodom po Minekusu, uzorak je prolazio dvije faze inkubacije u vodenoj kupelji koje su uključivale simulaciju probave u želucu i u crijevima. U Tablici 2. prikazane su kemikalije korištene za pripremu otopina koje simuliraju želučani i crijevni sok prema metodi po Minekusu.

Tablica 2. Količina otopina potrebnih da se naprave simulirane otopine želuca i crijeva.

	Količina (g)	Volumen (ml)	SGF (400 ml)	SIF (800 ml)
KCl	1,119	30	6,9	13,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,340	5	0,9	1,6
NaHCO <sub>3</sub>	10,080	120	12,5	85
NaCl	4,680	40	11,8	19,2
MgCl(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0,153	5	0,4	2,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,240	5	0,5	-
NaOH	1,999	50	-	-
HCl	12,49 ml	25	1,3	1,4
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	0,176	4	-	-

SGF - Simulated gastric fluid (Simulirana želučana tekućina)

SIF - Simulated intestinal fluid (Simulirana crijeva tekućina)

Neposredno prije korištenja, otopine SGF-a i SIF-a izvađene su iz hladnjaka te stavljene u vodenu kupelj kako bi se zagrijale na 37 °C. U Falcon epruvete (vol. 50 ml) uliveno je 7 ml svježeg soka pšenične trave. U uzorke su dodani pufer koji simulira želučanu tekućinu (SGF), pepsin, CaCl<sub>2</sub>, HCl i destilirana voda (Tablica 3).

Tablica 3. Količine kemikalije koje se dodaju po uzorku (Minekus i sur., 2014.)

KEMIKA LIJA	KOLIČINA (ml)	UKUPNA KOLIČINA
SGF	5,25	7 ml
pepsin	1,12	
CaCl <sub>2</sub>	0,0035	
1M HCl	0,46	
destilirana H <sub>2</sub> O	0,1665	
SIF	7,7	14 ml
pankreatin	3,5	
žuč	1,75	
CaCl <sub>2</sub>	0,028	
1M NaOH	0,105	
destilirana H <sub>2</sub> O	0,917	

Nakon toga uzorci su stavljeni u vodenu kupelj na 2 sata pri brzini treskanja od 190 i temperaturi od 37 °C. Kada je prošlo 30 minuta inkubacije, u uzorcima je izmjeren pH. U svim uzorcima, osim kontrole, pH vrijednost je bila  $3,0 \pm 0,25$ . Po završetku prve inkubacije, u uzorcima je pH podignut na  $6,0 \pm 0,25$  pomoću 0,105 ml 1 M NaOH. Osim NaOH, dodane su i otopine SIF-a, pankreatina, žuči,  $\text{CaCl}_2$  te destilirana  $\text{H}_2\text{O}$  (Tablica 3). Nakon toga, uzorci su stavljeni u vodenu kupelj na 2 sata pri brzini treskanja od 190 i temperaturi od 37 °C. Kada je završila inkubacija, uzorci su stavljeni na led 5 minuta, a potom na centrifugiranje 15 minuta na 4°C i 4000 rpm. Tekuća faza, do čijeg je odvajanja došlo prilikom centrifugiranja, prelivena je epruvete volumena 15 ml. Uzorci su pohranjeni na -80°C u ultra hladni zamrzivač.

### 3.5. Tehnika mjerenja na ICP-OES-u

Koncentracija cinka u uzorcima nakon provedene simulacije probave *in vitro* utvrđena je pomoću induktivno spregnute plazme - optičko emisijske spektrometrije (ICP-OES), proizvođača Perkin Elmer (model: Optima 2100 DV) (Slika 5). Izmjerene koncentracije cinka izražene su u  $\text{mg L}^{-1}$ .



Slika 5. Optima 2100 DV (Foto original: Marina Brica)

Očitavanje rezultata koncentracije Zn provedeno je u Laboratoriju za agroekologiju i zaštitu okoliša, Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijeku. Korišteni program prilikom analize rezultata bio je WinLab 32 ICP Continuos - Manual Analysis Control koji je povezan s navedenim ICP - OES uređajem.

### **3.6. Statistička obrada podataka**

Statistička analiza dobivenih podataka napravljena je pomoću programa SAS Enterprise Guide 7.12 Copyright© 2016 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Za analiziranje dobivenih podataka korištene su sljedeće mjere opisne statistike: aritmetička sredina, standardna devijacija, standardna pogreška aritmetičke sredine, koeficijent varijacije, minimum i maksimum. Razlike između ispitivanih metoda *in vitro* bioraspoloživosti utvrđene su t-testom na razini značajnosti od  $p < 0,01$ . Razlike u koncentraciji cinka između ispitivanih sorata, utvrđenih metodom po Minekusu, ispitane su jednofaktorijalnom analizom varijance. Za koncentracije bioraspoloživog cinka utvrđenih metodom po Kiersu, Levenovim testom je ispitana homogenost varijanci, te su razlike u srednjim vrijednostima ispitane Welchovom analizom varijance na razini značajnosti od  $p < 0,01$ .

## 4. Rezultati

### 4.1. Koncentracija cinka u soku od pšenične trave nakon provedene simulacije probave *in vitro*

Za simulaciju probave *in vitro* korištene su dvije metode. Prosječna koncentracija raspoloživog cinka utvrđena metodom po Kiersu iznosila je  $1,00 \pm 0,38 \text{ mg L}^{-1}$ . Prosječna koncentracija raspoloživog cinka utvrđena metodom po Minekusu bila je niža i iznosila je  $0,62 \pm 0,21 \text{ mg L}^{-1}$ . Raspon koncentracije cinka utvrđen metodom po Kiersu bio je  $1,3 \text{ mg L}^{-1}$  dok je raspon koncentracije Zn utvrđen metodom po Minekusu iznosio  $0,61 \text{ mg kg}^{-1}$  (Tablica 4). Varijabilnosti koncentracija bioraspoloživog Zn utvrđenog nakon simulacije probave metodom po Kiersu i nakon simulacije probave metodom po Minekusu nisu jako različite i iznose 37,86 odnosno 34,08% (Tablica 4).

Tablica 4. Mjere opisne statistike za koncentraciju Zn ( $\text{mg L}^{-1}$ ) u soku pšenične trave nakon provedene simulacije probave *in vitro*

Metoda	Prosječna vrijednost	Standardna devijacija	Minimum	Maksimum	Koeficijent varijacije	Medijana
Kiers	1,00	0,38	0,46	1,76	37,86	0,95
Minekus	0,62	0,21	0,28	0,89	34,08	0,68

### 4.2. Razlike između sorata pšenice u koncentraciji cinka nakon provedene simulacije probave *in vitro*

U istraživanje je bilo uključeno pet sorata ozime pšenice, no u nastavku su prikazani rezultati za četiri sorte zato što je kod sorte Eurofit u dva od četiri ponavljanja kod simulacije probave metodom po Minekusu, koncentracija Zn bila ispod praga detekcije.

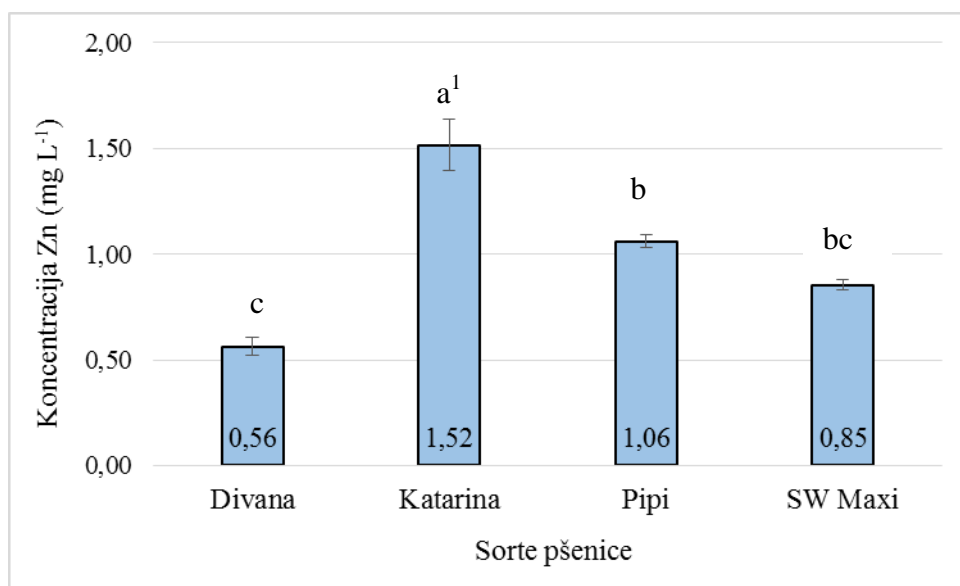
Najniža prosječna koncentracija Zn, nakon provedene simulacije probave po Kiersu utvrđena je u sorte Divane, a najviša u sorte Katarine (Tablica 5). Nakon simulacije probave metodom po Minekusu, najniža koncentracija Zn je također utvrđena u sorte Divane, a najviša u sorte Katarine (Tablica 5).

Tablica 5. Prosječne koncentracije cinka  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine ( $\text{mg L}^{-1}$ ) utvrđene metodom za ispitivanje *in vitro* bioraspoloživosti po Kiersu i metodom po Minekusu u ispitivanih sorata pšenice

Sorta	Kiers	Minekus
Divana	0,56 $\pm$ 0,04	0,30 $\pm$ 0,01
SW Maxi	0,85 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,02
Katarina	1,52 $\pm$ 0,12	0,84 $\pm$ 0,04
Pipi	1,06 $\pm$ 0,03	0,67 $\pm$ 0,02

Jednofaktorijalnom analizom varijance ispitane su razlike između prosječnih biodostupnih koncentracija cinka u soku od pšenične trave različitih sorata pšenice, za svaku metodu pojedinačno. Levenovim testom ispitana je homogenost varijanci i utvrđeno je da varijance nisu homogene ( $F = 12,62$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,01$ ). Zbog toga je za utvrđivanje razlika između srednjih vrijednosti tretmana korištena Welchova ANOVA. Za biodostupne koncentracije Zn izmjerene nakon simulacije probave metodom po Kiersu utvrđene su statistički značajne razlike između sorata ( $F = 34,16$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,01$ ) (Grafikon 1). Razlike između pojedinih sorata ispitane su Tukeyevim HSD testom (Grafikon 1).

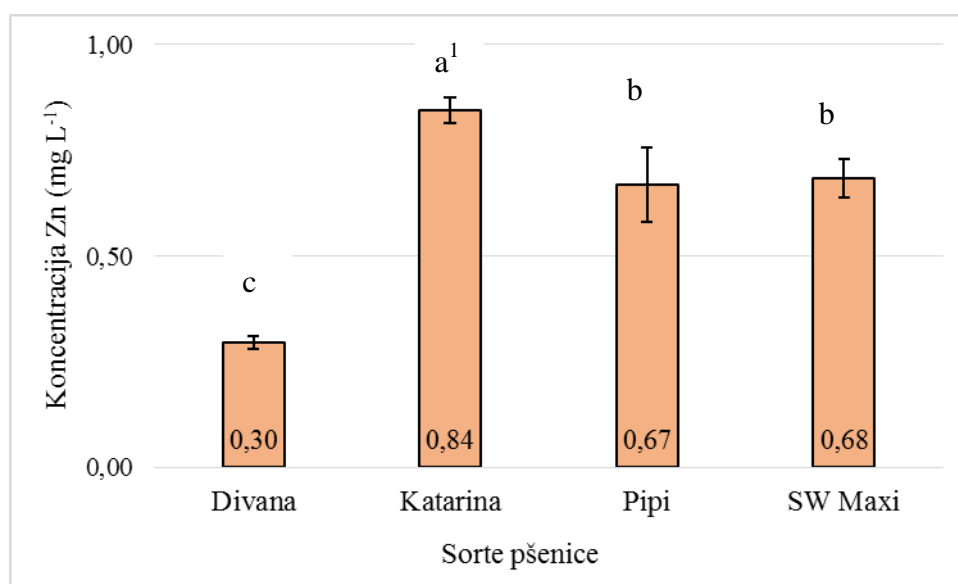
Grafikon 1. Razlike između sorata pšenice u prosječnoj bioraspoloživoj koncentraciji Zn ( $\text{mg L}^{-1}$ ) u soku pšenične trave izmjerene nakon simulacije probave metodom po Kiersu



<sup>1</sup>Sorte za koje su utvrđene statistički značajne razlike označene su različitim slovima (Tukey HSD,  $p < 0,01$ )

Levenovim testom ispitana je homogenost varijanci i utvrđeno je da su varijance prosječnih vrijednosti biodostupnih koncentracija Zn utvrđenih simulacijom probave po Minekusu homogene ( $F = 2,18$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,14$ ). Razlike između prosječnih vrijednosti sorata ispitivane su jednofaktorijalnom analizom varijance. Između srednjih vrijednosti utvrđene su statistički značajne razlike ( $F = 78,64$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,01$ ). Razlike između pojedinih sorata ispitane su Tukeyevim HSD testom (Grafikon 2).

Grafikon 2. Razlike između sorata pšenice u prosječnoj bioraspoloživoj koncentraciji Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) u soku pšenične trave izmjerene nakon simulacije probave metodom po Minekusu



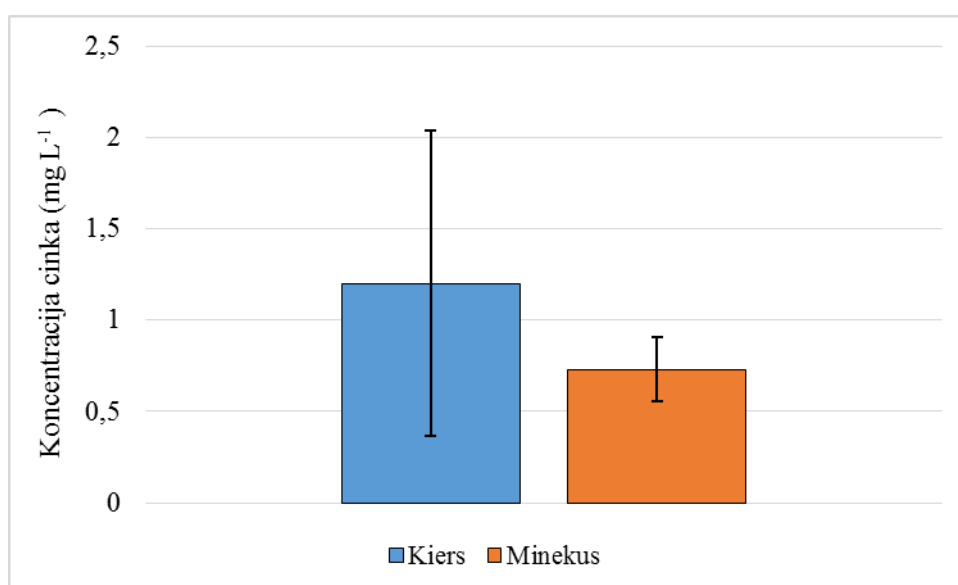
<sup>1</sup>Sorte za koje su utvrđene statistički značajne razlike označene su različitim slovima (Tukey HSD,  $p < 0,01$ )

#### 4.3. Razlike između primijenjenih metoda za simulaciju probave *in vitro*

Razlike u koncentraciji bioraspoloživog cinka, između metoda za simulaciju probave *in vitro* za svaku sortu pojedinačno ispitane su t-testom. Statistički značajne razlike s obzirom na koncentraciju cinka između metoda utvrđene su u svih ispitivanih sorata (Divana –  $t = 7,99$ ;  $df = 7$ ;  $p < 0,01$ , Katarina –  $t = 8,48$ ;  $df = 7$ ;  $p < 0,01$ , Pipi –  $t = 11,07$ ;  $df = 7$ ;  $p < 0,01$ , SW Maxi –  $t = 7,99$ ;  $df = 7$ ;  $p < 0,01$ ).

Tijekom provedbe ispitivanja, kao kontrolna sorta koja se ponavljala tijekom cijelog pokusa, korištena je sorta Felix. Prosječne koncentracije bioraspoloživog cinka u soku sorte Felix razlikovale su se ovisno o metodi simulacije probave (Grafikon 3). Prosječna koncentracija cinka utvrđena metodom simulacije probave po Kiersu bila je  $1,2 \pm 0,84 \text{ mg L}^{-1}$ , dok je metodom po Minekusu, utvrđena prosječna koncentracija cinka iznosila  $0,73 \pm 0,18 \text{ mg L}^{-1}$  (Grafikon 3).

Grafikon 3. Prosječna koncentracija cinka (prosjeak  $\pm$  standardna devijacija) utvrđena u soku pšenične trave sorte Felix nakon simulacije probave po Kiersu i Minekusu





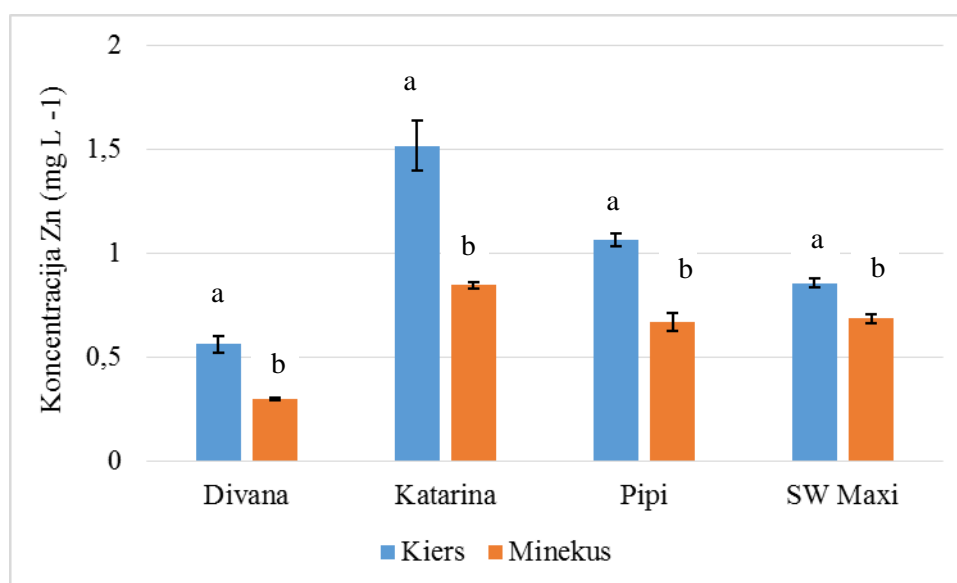
## 5. Rasprava

Uzimajući u obzir mnoštvo minerala koje sadrži zrno pšenice, ali i sok pšenične trave, postoje mnogi radovi u kojima se analiziraju isti zbog njihovog pozitivnog utjecaja na ljudsko zdravlje. Osim minerala poput kalija, kalcija, fosfora, magnezija, cinka, aluminijsa, bakra, natrija, sumpora, u nekim radovima mogu se naći i podaci o zabilježenim koncentracijama aminokiselina, askorbinske kiseline, vitamina E te karotena. Kada se govori o cinku u pšeničnoj travi, vrlo je malo radova koji daju podatke o njegovoj koncentraciji, a još manje o njegovoj bioraspoloživosti. S obzirom na to i činjenicu da trenutno nema standardizirane metode za simulaciju probave *in vitro*, cilj ovog rada bio je utvrditi razlike između sorata pšenice s obzirom na bioraspoložive koncentracije cinka u soku pšenične trave te ispitati razlike između metoda za simulaciju probave *in vitro*.

U provedenom istraživanju simulacija probave *in vitro* provodila se pomoću metode po Kiersu i metode po Minekusu. Metoda simulacije probave po Kiersu je starija metoda (Kiers i sur., 2001.) i prvenstveno je osmišljena za simulaciju probave na uzorcima leguminoza i žitarica. Metoda koju su koristili spomenuti autori, standardizirana je za simulaciju probave s ciljem usporedbe probavljivosti suhe tvari žitarica i leguminoza, a ne točnog oponašanja probave u ljudi. Za razliku od njih, Minekus i sur., (2014.), su objavili prijedlog standardizirane metode za simulaciju probave *in vitro*, kojoj je cilj što točnije oponašanje probave u ljudi, neovisno o vrsti uzorka. Prijedlog spomenute metode, nastao je u sklopu COST akcije INFOGEST (<https://www.cost-infogest.eu/ABOUT-Infogest>), kojoj je jedna od ciljeva bio harmonizacija metoda za simulaciju probave *in vitro*.

Iako su spomenute metode vrlo slične, rezultati bioraspoloživih koncentracije cinka utvrđeni različitim metodama statistički su se značajno razlikovali kod svih sorata (Grafikon 4). U pravilu, metodom po Minekusu, je u svih ispitivanih sorata pšenice, utvrđena niža bioraspoloživa koncentracija cinka, nego metodom po Kiersu (Grafikon 4). Najmanja razlika između koncentracija cinka utvrđenih različitim metodama simulacije probave utvrđena je u sorte SW Maxi (20%), a najviša u sorte Katarine (47%). Kod sorte Felix, koja se koristila kao kontrolna sorta tijekom cijelog istraživanja, također je simulacijom probave metodom po Minekusu utvrđena niža bioraspoloživa koncentracija cinka (39%) u odnosu na koncentraciju utvrđenu metodom po Kiersu.

Grafikon 4. Razlike između metoda za simulaciju probave *in vitro* (između prosjeka označenih istim slovom nisu utvrđene statistički značajna razlike ( $p < 0,01$ ))



Vezano uz usporedbu metoda za simulaciju probave *in vitro*, utvrđena je nešto manja varijabilnost između mjerenja za metodu po Minekusu (CV = 34%) u odnosu na metodu po Kiersu (CV = 38%). Na uzorcima sorte Felix, metoda po Minekusu je također dala manje varijabilne rezultate (CV = 24%) u odnosu na rezultate utvrđene metodom po Kiersu (CV = 69%). Navedeni rezultati ukazuju na to da metoda po Minekusu ima bolju ponovljivost od metode po Kiersu. S obzirom da je ispitivanje provedeno na samo pet sorata, te da je u analizi obrađena koncentracija samo jednog elementa, za utvrđivanje metode koja bi bila bolja, u smislu preciznosti i ponovljivosti, bilo bi potrebno provesti analizu na većem broju uzoraka.

U provedenom istraživanju utvrđene su statistički značajne razlike u koncentracijama cinka između sorata, neovisno o metodi simulacije probave (Grafikon 1 i 2). Takvi rezultati nisu neočekivani, s obzirom da su za ispitivanje izabrane sorte koje su se razlikovale po koncentraciji cinka u zrnu. Općenito je poznato, da postoji sortna specifičnost s obzirom na koncentraciju cinka u zrnu pšenice (Zhao i sur., 2008.; Shi i sur., 2008.; Bityutskii i sur.; 2017.). Različite koncentracije cinka u različitim frakcijama zrna utvrdili su Hussain i sur. (2013.). Gledajući rezultate navedenih istraživanja zajedno, prosječne koncentracije cinka u zrnu kretale su se između 20 – 50 mg kg<sup>-1</sup>. Osim sortne specifičnosti, razlog varijabilnosti u

utvrđenim koncentracijama cinka u zrnu, su i različiti uvjeti uzgoja te različite metode utvrđivanja cinka u zrnu. Kod uzgoja pšenične trave za pripremu soka u provedenom istraživanju, pšenica se uzgajala 12 dana u komori za rast biljaka. Biljke pšenice su rasle u plitkim posudama u organskom supstratu. S obzirom da se uzorkovanje pšenice za pripremu soka, radi 12. dan nakon sjetve, pretpostavlja se da biljka za rast i razvoj većinom koristi hranjive tvari iz zrna, jer korijenski sustav još nije dovoljno razvijen. Prema tome, može se pretpostaviti da će kod sorata koje su imale višu koncentraciju cinka u zrnu, veća koncentracija biti i u soku pšenične trave.

Osim utjecaja sorte na koncentraciju i bioraspoloživost cinka u soku pšenične trave imaju i uvjeti uzgoja (trajanje uzgoja, osvjetljenje, temperatura, supstrat) i metoda za simulaciju probave. Značajne razlike u koncentraciji cinka s obzirom na uvjete razvoja pšenične trave, ali i s obzirom na metodu *in vitro* probave utvrdili su Kulkarni i sur. (2006.).

Ghumman i sur. (2017.) su ispitivali mineralni sastav soka i praha dvije vrste pšenice (RAJ3765 i PBW343). Prilikom analize soka pšenične trave stare 15 dana koncentracija cinka bila je 0,14 mg L<sup>-1</sup> za sortu RAJ3765, dok je za sortu PBW343 ona iznosila 0,17 mg L<sup>-1</sup>. U provedenom istraživanju, utvrđene su znatno više koncentracije cinka u soku pšenične trave (Grafikon 1 i 2). Osim soka, Ghumman i sur. (2017.) su ispitivali i prah pšenične trave te su utvrdili više koncentracije cinka nego u soku (RAJ3765 - 0,739 mg L<sup>-1</sup>, PBW343 - 0,96 mg L<sup>-1</sup>).

Velike razlike u koncentracijama cinka u pšeničnoj travi, ovisno o uvjetima sjetve i starosti pšenične trave, utvrdili su Reddy i sur. (2008.). Utvrdili su da koncentracija cinka raste s porastom starosti pšenične trave, no nakon 8. dana ostaje konstantna. Utvrđena bioraspoloživa koncentracija cinka kretala se u rasponu od 11,6 do 76,8 µg g<sup>-1</sup>, ovisno o uvjetima uzgoja.

Osim cinka, sok pšenične trave, sadrži druge minerale. Chauhan (2014.) je analizirao vitamine i minerale u soku pšenične trave. Kada govorimo o koncentraciji minerala, najveću koncentraciju imao je kalij (57 mg 100 ml<sup>-1</sup>). Velika razlika je uočena između kalija i prvog idućeg elementa s najvećom koncentracijom, a to je bio fosfor kojeg je bilo 8,2 mg 100 ml<sup>-1</sup>. Koncentracija cinka iznosila je 0,02 mg 100 ml<sup>-1</sup>, te se uz bakar (0,007 mg 100 ml<sup>-1</sup>) nalazio na samom dnu zabilježenih koncentracija minerala.

Jedan od ciljeva provedenog istraživanja bio je utvrditi koncentraciju cinka pomoću dvaju metoda *in vitro* bioraspoloživosti iz soka pšenične trave koji je dobiven na način na koji ju ljudi kod kuće uzgajaju za vlastite potrebe tj. na način na koji se ona najčešće konzumira. Sok pšenične trave predstavlja dodatak prehrani koji ima pozitivan učinak na zdravlje ljudi. Preporučena dnevna količina soka je 30 ml soka ili 1,5 g praha pšenične trave. S druge strane, preporučena dnevna količina cinka je 15 mg. Na temelju rezultata ovog istraživanja, prilikom konzumiranja preporučene dnevne količine soka pšenične trave moglo bi biti zadovoljeno manje od 1% dnevnih potreba za cinkom.

## 6. Zaključak

Na temelju laboratorijskih istraživanja na uzorku od pet sorata pšenice, provedenih na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek, tijekom 2018. godine, s obzirom na bioraspoloživost cinka iz svježeg soka pšenične trave, može se zaključiti sljedeće:

1. Manja varijabilnost između mjerenja utvrđena je za metodu po Minekusu.
2. Statistički značajne razlike s obzirom na koncentraciju cinka između metoda utvrđene su u svih sorata pšenice.
3. Statistički značajne razlike između ispitivanih sorata utvrđene su kod obje metode.
4. Bioraspoložive koncentracije cinka su od 20 do 47 % niže kod metode po Minekusu u odnosu na metodu po Kiersu.
5. Neovisno o metodi simulacije probave, najniža bioraspoloživa koncentracija cinka utvrđena je u sorte Divane, a najviša u sorte Katarine.

## 7. Popis literature

- Best, C., H., Ridout, J., H. (1993.): The effects of cholesterol and choline on deposition of liver fat. *The Journal of Physiology*, 78(4):415-418.
- Bityutskii, N., Yakkonen, K., Loskutov, I. (2017.): Content of iron, zinc and manganese in grains of *Triticum aestivum*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare* and *Avena sativa* cultivars registered in Russia. *Genetic resources and crop evolution* 64:1955-1961.
- Chauhan, M. (2014.): A pilot study on wheat grass juice for its phytochemical, nutritional and therapeutic potential on chronic diseases. *International journal of chemical studies*, 2(4):27-34.
- Dey, S., Sarkar, R., Ghosh, P., Khatun, R., Ghorai, K., Choundhury, R., Ahmed, R., Gupta, P., Mukhopadhyay, S., Mukhopadhyay, A. (2006.): Effect of wheat grass juice in supportive care o terminally ill cancer patients- A tertiary cancer centre experience from Inida,. *Journal of Clinical Oncology* 24, 8634-8634.
- Etcheverry, P., Grusak, M.A., Fleige, E.L. (2012.): Application of *in vitro* bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc and vitamins B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, D, and E. *Front Physiol*, 3:317.
- Feldman, M., Smart, J., Simmonds, N.W. (1995.) *Wheats: Evolution of crop plants*, Harlow, Ujedinjeno Kraljevstvo, Longman scientific and technical, 185-192.
- Ghumman, A., Narpinder, S., Kaur, A. (2017.): Chemical, nutritional and phenolic composition of wheatgrass and pulse shoots. *International journal of food science and technology*.
- González-Esteban, Á.L. (2017.): Why wheat? International patterns of wheat demand, 1939–2010. *Economic History Research*, 13(3), 135-150.
- Handzel, M., Sibert, J., Harvey, T., Deshmukh, H., Chambers, C. (2008.): Monitoring the oxygenation of blood during excercise after ingesting wheatgrass juice. *The internet journal of alternative medicine* (1): 1-5.
- Holst, B., Williamson, G., (2008.): Nutrients and phytochemical: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19:73-82.

- Hussain, S., Maqsood, A.M., Rengel, Z., Aziz, T., Abid, M. (2013.) Estimated zinc bioavailability in milling fractions of biofortified wheat grains and in flours of different extraction rates. *International journal of agriculture and biology*. 15:921-926.
- Hvatum, M., Kanerud, L., Hallgren, R., Brandtzaeg, P. (2006.): The gut–joint axis: cross-reactive food antibodies in rheumatoid arthritis. *Gut*; 55:1240–1247.
- Kiers, L.J., MJ Nout, R., Rombouts, F.M. (2001.): *In vitro* digestibility of processed and fermented soya bean, cowpea and maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1325-1331.
- Kulkarni, S.D., Acharya, R., Rajurkar, N.S., Reddy, A.V.R. (2007.): Evaluation of bioaccessibility of some essential elements from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) by *in vitro* digestion method. *Food Chem*, 103: 681-688.
- Marwaha, R.K., Bansal, D., Kaur, S., Trehan, A. (2004.): Wheat grass juice reduces transfusion requirement in patients with thalassemia major: a pilot study. *Indian Pediatr*, 41: 716-720.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Menard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickhman, M.S.J., Weitschies, W., Brodkorb, A. (2014.): A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food function* 5, 1113-1124.
- Mujoriya, R., Bodla, RB. (2011.): A study on wheat grass and its Nutritional value. *Food Science and Quality Management*, 2: 1-8.
- Padalia, S., Drabu, S., Raheja, I., Gupta, A., Dhamija, M. (2010.): Multitude potential of wheatgrass juice (Green Blood): An overview. *Chron young sci*, 1: 23.
- Rana, S., Kamboj, J.K., Gandhi, V. (2011.): Living the natural way – Wheatgrass and Health. *Functional Foods in Health and Disease* 11:444-456.
- Reddy, A.V.R., Acharya, R., Nair, A.G.C., Kulkarni, S.D.C., Rajurkar, N.S. (2008.): Studies on tender wheatgrass: estimation of elemental content, bioaccessibility of essential elements and antioxidant activity, Bhabha atomic research centre, Mumbai, India.

Rodriguez, R.R., Basta, N.T., Casteel, S.W., Pace, L.W. (1999.). An in vitro gastrointestinal method to estimate bioavailable arsenic in contaminated soils and solid media. Environ. Sci. Technol. 33: 642-649.

Scholz, S., Williamson, (2007.): Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols *in vivo*. International journal for vitamin and nutrition research 77(3):224-35.

Shewry, P.R. (2009.): Wheat. J Exp bot 60: 1537-1553.

Shi, R., Li, R., Tong, Y., Jing, R., Zhang, F., Zou, C. (2008.): Identification of quantitative trait locus of Zinc and phosphorus density in wheat (*Triticum aestivum* L.) grain. Plant and soil.306:95-104.

Vukadinović, V., Vukadinović, V. (2011): Ishrana bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

Wheat, J., Currie, G. (2008.): Herbal medicine for cancer patients: An evidence based review. Internet Journal of Alternative Medicine 5(2).

Zhao, F.J., Su, Y.H., Dunham, S.J., Rakszegi, M., Bedo, Z., McGrath, S.P., Shewry, P.R. (2008.): Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin. Journal of cereal science. 290-295.

Wigmore, A. (1985.): The wheatgrass book: How to grow and use wheatgrass to maximize your health and vitality

<http://161.53.194.251/~wheat4grass/> (10.9.2018.)

<http://scitechconnect.elsevier.com/bioavailability-bioaccessibility-bioactivity-food-components/> (16.9.2018.)



## 8. Sažetak

Sok pšenične trave pravi se od mladih biljka pšenice (*Triticum aestivum* L.), a može se koristiti u prehrani ljudi i životinja. Njegova upotreba u medicinske svrhe sve je češća. Cilj rada bio je ispitati varijabilnost soka pšenične trave (sorte: Pipi, Divana, Katarina, Felix, Sw Maxi i Eurofit) s obzirom na bioraspoloživost cinka. Osim toga, u radu su uspoređene dvije metode za simulaciju probave *in vitro* (Kiers, 2001. i Minekus i sur. 2014.). Bioraspoložive koncentracije cinka u soku pšenične trave utvrđene su pomoću induktivno spregnute plazme - optičko emisijske spektrometrije (ICP-OES). Ispitivane sorte značajno se razlikuju po bioraspoloživim koncentracijama cinka u soku pšenične trave.

Ključne riječi: pšenična trava, cink, *in vitro* bioraspoloživost, probavljivost, funkcionalna hrana

## 9. Summary

Wheatgrass juice is made from young wheat plants (*Triticum aestivum* L.) and it can be used in human or animal diet. Its use for medicinal purposes is significantly growing. The aim of this research was to examine the variability of wheatgrass juice (varieties: Pipi, Divana, Katarina, Felix, Sw Maxi i Eurofit) with respect to the bioavailability of zinc. In addition, the study compares two methods for simulation of *in vitro* digestion (Kiers 2001, Minekus et al. 2014). The bioavailability of zinc concentration in wheatgrass juice was determined by inductively coupled plasma, i.e. optical emission spectrometry (ICP-OES). The bioavailable concentration of zinc in wheatgrass juice is significantly different in the examined varieties.

Key words: wheatgrass juice, zinc, *in vitro* bioavailability, digestibility, functional food

## 10. Popis tablica

Broj	Naziv tablice	Stranica
Tablica 1.	Kemikalije potrebne za metodu po Kiersu i sur. (2001.)	11
Tablica 2.	Količina otopina potrebnih da se naprave simulirane otopine želuca i crijeva	14
Tablica 3.	Količine kemikalije koje se dodaju po uzorku (Minekus i sur., 2014.)	14
Tablica 4.	Mjere opisne statistike za koncentraciju Zn ( $\text{mg L}^{-1}$ ) u soku pšenične trave nakon provedene simulacije probave <i>in vitro</i>	17
Tablica 5.	Prosječne koncentracije cinka $\pm$ standardna pogreška aritmetičke sredine ( $\text{mg L}^{-1}$ ) utvrđene metodom za ispitivanje <i>in vitro</i> bioraspoloživosti po Kiersu i metodom po Minekusu u ispitivanih sorata pšenice	18

## 11. Popis slika

Broj	Naziv slike	Stranica
Slika 1.	Naklijavanje, sjetva i rast pšenične trave (Foto original: Matej Kurilj)	9
Slika 2.	Priprema svježeg soka od pšenične trave i priprema uzoraka za simulaciju probave <i>in vitro</i> (izvor: <a href="http://161.53.194.251/~wheat4grass/gallery/">http://161.53.194.251/~wheat4grass/gallery/</a> )	10
Slika 3.	Vodena kupelj s treskalicom ( izvor: <a href="http://161.53.194.251/~wheat4grass/gallery/">http://161.53.194.251/~wheat4grass/gallery/</a> )	12
Slika 4.	Tekuća i kruta faza uzorka ( Foto original: Matej Kurilj)	13
Slika 5.	Optima 2100 DV (Foto original: Marina Brica)	15

## 12. Popis grafikona

Broj	Naziv grafikona	Stranica
Grafikon 1.	Razlike između sorata pšenice u prosječnoj bioraspoloživoj koncentraciji Zn ( $\text{mg L}^{-1}$ ) u soku pšenične trave izmjerene nakon simulacije probave metodom po Kiersu	18
Grafikon 2.	Razlike između sorata pšenice u prosječnoj bioraspoloživoj koncentraciji Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) u soku pšenične trave izmjerene nakon simulacije probave metodom po Minekusu	19
Grafikon 3.	Prosječna koncentracija cinka (prosjek $\pm$ standardna devijacija) utvrđena u soku pšenične trave sorte Felix nakon simulacije probave po Kiersu i Minekusu	20
Grafikon 4.	Razlike između metoda za simulaciju probave <i>in vitro</i> (između prosjeka označenih istim slovom nisu utvrđene statistički značajna razlike	22

VARIJABILNOST PŠENIČNE TRAVE (*Triticum*) S OBZIROM NA BIORASPOLOŽIVOST CINKA –  
USPOREDBA *IN VITRO* METODA

Matej Kurilj

**Sažetak:** Sok pšenične trave pravi se od mladih biljka pšenice (*Triticum aestivum* L.), a može se koristiti u prehrani ljudi i životinja. Njegova upotreba u medicinske svrhe sve je češća. Cilj rada bio je ispitati varijabilnost soka pšenične trave ( sorte: Pipi, Divana, Katarina, Felix, Sw Maxi i Eurofit ) s obzirom na bioraspoloživost cinka. Osim toga, u radu su uspoređene dvije metode za simulaciju probave *in vitro* (Kiers, 2001. i Minekus i sur. 2014.). Bioraspoložive koncentracije cinka u soku pšenične trave utvrđene su pomoću induktivno spregnute plazme - optičko emisijske spektrometrije (ICP-OES). Ispitivane sorte značajno se razlikuju po bioraspoloživim koncentracijama cinka u soku pšenične trave.

**Rad je izrađen pri:** Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Andrijana Rebekić

**Broj stranica:** 33

**Broj grafikona i slika:** 9

**Broj tablica:** 5

**Broj literaturnih navoda:** 30

**Broj priloga:**

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** pšenična trava, cink, *in vitro* bioraspoloživost, probavljivost, funkcionalna hrana

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. izv.prof.dr.sc. Sonja Petrović, predsjednik

2. izv.prof.dr.sc. Andrijana Rebekić, mentor

3. izv.prof.dr.sc. Miroslav Lisjak, član

**Rad je pohranjen u:** Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira

Preloga 1

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Graduate thesis

Faculty of agrobiotechnical science Osijek

University Graduate Studies, Plant production, course Plant breeding and seedling

Variability of wheatgrass (*Triticum*) in zinc bioavailability - comparison of *in vitro* methods

Matej Kurilj

Wheatgrass juice is made from young wheat plants (*Triticum aestivum* L.) and it can be used in human or animal diet. Its use for medicinal purposes is significantly growing. The aim of this research was to examine the variability of wheatgrass juice (varieties: Pipi, Divana, Katarina, Felix, Sw Maxi i Eurofit) with respect to the bioavailability of zinc. In addition to this, the study compares two methods for simulation of *in vitro* digestion (Kiers 2001, Minekus et al. 2014). The bioavailability of zinc concentration in wheatgrass juice was determined by inductively coupled plasma, i.e. optical emission spectrometry (ICP-OES). The bioavailable concentration of zinc in wheatgrass juice is significantly different in the examined varieties.

**Thesis performed at:** Faculty of agrobiotechnical science Osijek

**Mentor:** izv.prof.dr.sc. Andrijana Rebekić

**Number of pages:** 33

**Number of figures:** 9

**Number of tables:** 5

**Number of references:** 30

**Number of appendices:**

**Original in:** Croatian

**Key words:** wheatgrass juice, zinc, *in vitro* bioavailability, digestibility, functional food

**Thesis defended on date:**

**Reviewers:**

1. izv.prof.dr.sc. Sonja Petrović, predsjednik
2. izv.prof.dr.sc. Andrijana Rebekić, mentor
3. izv.prof.dr.sc. Miroslav Lisjak, član

Thesis deposited at: Library, Faculty of agrobiotechnical science Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira preloga 1